

Translated from Japanese by  
SCIENTIFIC TRANSLATION SERVICES  
411 Wyntre Lea Dr.  
Bryn Mawr, PA 19010

202-063

- (19) Patent Office of Japan (JP)  
(12) Patent Disclosure Bulletin (A)  
(11) Patent Disclosure No.: Hei 10-[1998]-84,999  
(43) Disclosure Date: April 7, 1998

(51)	Int. Cl. <sup>6</sup>	Identification Code	FI	
	C12Q 1/68		C12Q 1/68	A
	C07H 21/04		C07H 21/04	B
	C12N 15/09	ZNA	G01N 21/64	Z
	G01N 21/64		C12N 15/00	ZNAA

Request for examination: not requested      No. of claims: 2      FD      (Total 6 pages)

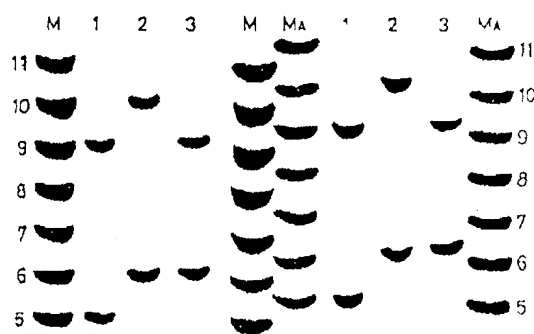
- (21) Application No.: Hei 8-[1996]-269,370  
(22) Application Date: September 19, 1996  
(71) Applicant: 000233480  
Hitachi Denshi Engineering Co. Ltd.  
16-3, Higashi 3-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to  
(72) Inventor: H. Hagiwara  
Hitachi Denshi Engineering Co. Ltd.  
16-3, Higashi 3-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to  
(72) Inventor: M. Utsi  
Hitachi Denshi Engineering Co. Ltd.  
16-3, Higashi 3-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to  
(72) Inventor: T. Sakurai  
Hitachi Denshi Engineering Co. Ltd.  
16-3, Higashi 3-chome, Shibuya-ku, Tokyo-to  
(74) Agent: K. Kajiyama, Patent Attorney (and one other)

(54) [Title of the Invention] POLYMORPHISM ANALYSIS METHOD

(57) [Abstract] (revision included)

[Object] To provide a new polymorphism analysis method capable of analyzing a multiple number of specimens at the same time even when using only one fluorescence dye.

[Means for Accomplishing the Object] In the polymorphism analysis method in which a mixture of two kinds of primers and DNA specimens is amplified by the PCR technique, the fluorescence-labeled, amplified product thus obtained is injected into the electrophoresis lane of a fluorescence sequencer gel electrophoresis plate for electrophoresis to allow the product to migrate in the gel electrolyte layer, the migrated fluorescence-labeled amplified product is irradiated with an excitation light, the fluorescence emitted from the product is measured to form a ladder pattern of the nucleic acid specimens being analyzed and the formed ladder pattern is compared with the standard pattern, more than one but less than the number of bases equal to that of the bases constituting the said multiple pattern region minus one are added to the said nonfluorescence-labeled primer, this base-added primer is used to form a PCR amplified product and this product together with the PCR amplified product obtained with the use of the original primer without added bases are subject to electrophoresis for analyzing more than two kinds of species at the same time.



### [Scope of the Patent Claims]

[Claim 1] Polymorphism analysis method, characterized in that in the polymorphism analysis method in which one of the two kinds of primers used in the analysis that have been designed to sandwich the specific polymorphic region of the DNA specimen to be analyzed is labeled with a single fluorescence dye, a mixture of this fluorescence dye-labeled primer, the nonfluorescence-labeled primer and the DNA specimens is amplified by the PCR technique, the fluorescence-labeled amplified product thus obtained is injected into the electrophoresis lane of a fluorescence sequencer gel electrophoresis plate for electrophoresis to allow the product to migrate in the gel electrolyte layer, the migrated fluorescence-labeled amplified product is irradiated with an excitation light, the fluorescence emitted from the product is measured to form a ladder pattern of the nucleic acid specimen being analyzed and the formed ladder pattern is compared with the standard pattern of the allelic ladder size marker that can be used as the standard having the same polymorphic region as that mentioned above to detect the number of repeats of the polymorphism of the DNA specimen being analyzed, more than one but less than the number of bases equal to that of the bases constituting the said polymorphic region minus one are added to the said nonfluorescence-labeled primer, this base-added primer is used to form a PCR amplified product and this PCR amplified product obtained from the base-added primer together with the PCR amplified product obtained with the use of the original primer without added bases are subject to electrophoresis for analyzing more than two kinds of species at the same time.

[Claim 2] Polymorphism analysis method in accordance with claim 1, in which the polymorphic region of TH01 made of four connected bases of [AATG] is used as the allelic ladder size marker and one to three bases are added to the primer for analyzing four kinds of specimens at the same time.

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] The present invention pertains to a fragment analysis method for making a multiple sample treatment possible in the analysis of the fragment length of nucleic acids such as DNA. More specifically, the present invention pertains to a polymorphism analysis method that makes multiple analyses in the same base pair (bp) size region possible in the analysis of the fragment length of DNA in a fluorescence type fragment analyzer.

[0002]

[Prior Art] The information that can be obtained from the functional analyses of DNA is numerous. For example, by knowing the base sequence of the characteristic genes made of adenine (A), guanine (G), thymine (T) and cytosine (C), identification or determination of species will become possible. These functional analyses can be carried out with the use of a fluorescence type sequencer.

[0003] It has been shown that repeats of specific base tandems are present in the base sequence in animals as well as in plants. The number of these repeats varies in each individual and this phenomenon is called "polymorphism." The repeat involving a short base tandem (about 2-5 bp) is called STR (short tandem repeat) and the method for identifying the species or determining the individual by the sequences of these 2-5 bp is called an STR method.

[0004] For example, for the identification of individual human beings, the polymorphic regions consisting of the four-base sequence [AATG] called TH01 are used. In this method, the region including the polymorphic part is labeled with a fluorescence marker and amplified by the PCR method and then detected by a fluorescence sequencer equipped with an electrophoresis mean. In this way, several patterns can be separated based on the difference in the electrophoresis velocity (degree of migration) of DNA fragments due to the different numbers of repeats in the polymorphic region.

[0005] The human gene consists of two sets of chromosomes (44 autosomes and 2 sex chromosomes), one set (22 autosomes and 1 sex chromosomes) from the father and one set from the mother. For example, if there are 5 repeats and 9 repeats in the base repeat region called [AATG] (namely, -AATGAATGAATGAATGAATG- and -AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG-, respectively) from the father and 6 and 10 repeats from the mother, then their child should have any one type of repeat regions of 5-6, 5-10, 9-6 and 9-10. The determination of parentage, etc. can be achieved by identifying the patterns such as those mentioned above. For the identification of an individual, examination of a multiple number of the regions such as those mentioned above can increase the probability of confirming that individual.

[0006] Figure 2 shows one example of ladder patterns obtained from the determination of parentage using the allelic ladder marker of TH01. The allelic ladder marker of TH01 itself is well known. It has been marketed for general use by Promega Co. of the United States as one of the GenePrint STR Systems. The fluorescence-labeled primer, which is so designed that the polymorphic region of TH01 is sandwiched between the basic DNA obtained from the parents and their child, is amplified by the PCR method. The fluorescence-labeled amplified products are injected into each electrophoresis lane of the gel electrophoresis plate of a fluorescence sequencer for electrophoresis to obtain ladder patterns such as those shown in Figure 2. M denotes the allelic ladder marker that can be used as the standard and the numerals on the left indicate the number of repeats of the polymorphism. These ladder patterns reveal that the sample from the father injected into lane 1 gives a pattern of 5 and 9 repeats, the sample from the mother injected into lane 2 gives a pattern of 6 and 10 repeats and the sample from the child injected into lane 3 gives a pattern of 9 and 6 repeats. These results, therefore, confirmed genetically the presence of a parent and child relationship between them.

[0007] In the case of the identification of an individual, it is necessary to carry out the same type of analysis on other polymorphic regions in order to ensure the reliability of identification. For example, the polymorphic region of F13B has been used together with the polymorphic region of TH01 in the identification of an individual. The polymorphic region of F13B contains the tandem bases made of [AAAT]. However, the size of the allelic ladder having the polymorphic region of TH01 is in the range of 179-203 bp, while the size of the allelic ladder having the polymorphic region of F13B is in the range of 169-189 bp; the numbers of known repeats of the polymorphic region of TH01 are 5, 6, 7, 8, 9, 9, 3, 10, 11 and the numbers of known repeats of the polymorphic region of F13B are 6, 7, 8, 9, 10, 11. Therefore, when these two polymorphic regions are used for the identification of an individual, an overlap part may occur in the ladder pattern obtained.

[0008] Therefore, in the prior-art polymorphism analysis using a fluorescence sequencer, each primer with polymorphic region is labeled with various fluorescence dyes having different excitation wavelengths. Because different fluorescence dyes are used to label each primer, the wavelengths of fluorescence emitted from each primer are different. The data corresponding to each fluorescence wavelength are assigned, e.g., with a green color and a red color and the data obtained are displayed on a CRT screen by a green color and a red color or are output by a color printer. In this way, it is possible to accurately determine to which polymorphic region each of the obtained ladder patterns belongs even though the ladder patterns may overlap because the bp sizes of DNA fragments are the same.

[0009] However, when a multiple number of fluorescence dyes are used, the fluorescence sequencer used in the analysis itself has to be equipped with excitation light sources, the number of which should correspond to the number of fluorescence dyes used, or a multiple number of band-path filters for separating a multiple number of fluorescence wavelengths. Installation of a multiple number of excitation light sources or band-path filters is not desirable because it will make the structure of the light source system and the light receiving system of the fluorescence sequencer complicated and will increase the size of the whole device. In addition, the cost of the sequencer will increase dramatically.

[0010]

[Object of the Invention] Therefore, the object of the present invention is to provide a new polymorphism analysis method with which a multiple number of specimens can be analyzed at the same time with the use of only a single fluorescence dye.

[0011]

[Means for Accomplishing the Object] The object mentioned above can be accomplished with the use of the polymorphism analysis method, characterized in that in the polymorphism method in which one of the two kinds of primers used in the analysis that have been designed to sandwich the specific polymorphic region of the DNA specimen to be analyzed is labeled with a single fluorescence dye, a mixture of this fluorescence dye-labeled primer, the nonfluorescence-labeled primer and the DNA specimens is amplified by the PCR technique, the fluorescence-labeled amplified product thus obtained is injected into the electrophoresis lane of a fluorescence sequencer gel electrophoresis plate for electrophoresis to allow the product to migrate in the gel electrolyte layer, the migrated fluorescence-labeled amplified product is irradiated with an excitation light, the fluorescence emitted from the product is measured to form a ladder pattern of the nucleic acid specimen being analyzed and the formed ladder pattern is compared with the standard pattern of the allelic ladder size marker that can be used as the standard having the same polymorphic region as that mentioned above to detect the number of repeats of the

polymorphism of the DNA specimen being analyzed, more than one but less than the number of bases equal to that of the bases constituting the said polymorphic region minus one are added to the said nonfluorescence-labeled primer, this base-added primer is used to form a PCR amplified product and this PCR amplified product obtained from the base-added primer together with the PCR amplified product obtained with the use of the original primer without added bases are subject to electrophoresis for analyzing more than two kinds of species at the same time.

[0012]

**[Embodiment of Implementation of the Invention]** When the polymorphic region of, e.g., TH01 is used as the standard allelic ladder size marker, since this polymorphic region is made of four bases [AATG], one, two or three bases may be added to the primer to be used for the PCR method in the present invention. In this way, four kinds of primers including the original primer without added base can be used to simultaneously analyze four specimens.

[0013] The PCR technique itself for producing the PCR amplified product needed for use in the polymorphism analysis method of the present invention is well known in this field of studies. Figure 3 is a schematic drawing for explaining the principle of the PCR technique. First of all, the target DNA specimen to be analyzed is prepared in step 1. The DNA specimen can be obtained from any human materials such as hair, nails, skin, blood, lymphocytes, etc. Next, in step 2, two kinds of primers appropriate for the two strands of the target DNA (e.g., oligonucleotides of about 20mer) are selected. They are mixed and subject to heat denaturation and annealing treatments to carry out DNA synthesis. The DNA synthesized by the denaturation and annealing treatments is converted to two single strands through the Taq polymerase reaction (step 3). Thereafter, the heat denaturation, annealing and Taq polymerase reactions will proceed merely by changing the temperature (step 4). This step is repeated  $n$  times. Theoretically, the number of DNA will double in each step. Therefore, after the completion of  $n$  steps, the number of DNA to be analyzed will be amplified by  $2^n$  times to obtain the amplified product (step 5).

[0014] Primers for the formation of the PCR amplified product needed for use in the polymorphism analysis method of the present invention that are suitable for various polymorphic regions are available commercially from Promega Co. of the United States as the GenePrint STR systems. Therefore, in the actual analysis, the primer synthesizing kit suitable for each of various polymorphic regions is purchased from the Promega Co. and the DNA specimen to be analyzed is mixed with this synthesizing kit to carry out the PCR process. In this way, the desired DNA amplified product can be obtained easily.

[0015] The addition of 1-3 bases to the primer in order to change the size of the primer can be achieved easily with the use of a commercially available DNA synthesizer. Such a DNA synthesizer that can be used in the present invention includes, e.g., the Cyclon (registered brand name) Plus DNA/RNA Synthesizer manufactured by Millipore Co. of the United States. The base can be added to one or both primer 1 and primer 2. From an economical standpoint, however, it is desirable to add the base only to primer 1 because primer 2 is to be used for adding a fluorescence label. Of course, the base may be added to primer 2 and the fluorescence dye is added to primer 1. There is no specific restriction as to the type of bases used for the addition but it is desirable that the base used is selected from among the DNA constituting bases of A, T, C and G. It is also desirable that the addition of bases will not result in the formation of a base sequence identical to that of a known polymorphism.

[0016] The addition of a fluorescence dye to primer 2 can be achieved easily with the use of a commercially available DNA synthesizer. Such a DNA synthesizer includes, e.g., the said Cyclon Plus DNA/RNA synthesizer. For example, when the DNA synthesizer is to be used for synthesizing primer 2, first of all, an amino group is added to the terminal part (namely, the 5' side or the 5' terminal) of primer 2 and then a fluorescence dye is chemically bonded to this position. The DNA synthesizer can also be used to add the amino group to the 5' terminal of primer 2. There is no specific restriction as to the type of fluorescence dyes that can be used in the present invention. When a laser beam is to be used to excite the fluorescence dye, the combination of the excitation wavelength of the laser beam and the emission wavelength of the fluorescence dye should be taken into consideration in the selection of the fluorescence dye. The fluorescence dyes that can be used in the present invention include, e.g., fluorescein isothiocyanate (FITC), eosin isothiocyanate (EITC), tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TMRITC), substituted rhodamine isothiocyanate (XRITC), sulforhodamine 101 acid chloride (marketed under the commercial brand name of "Texas Red"), etc. When the He-Ne laser with a wavelength of 615 nm is to be used as the source of the excitation light, it is desirable that the fluorescence dye used is "Texas Red" with maximum excitation wavelength at 596 nm and the maximum emission wavelength at 615 nm. When the argon ion laser with wavelength at 488 nm is to be used, it is desirable that the fluorescence dye used is FITC. A chemical phosphorescent agent may also be used as long as its use will not interfere with the hybridization of the

primer and the DNA chain (PCR product) or will not interfere with the elongation reaction in the direction of the 3' terminal by a polymerase.

[0017] The allelic ladder size marker standards having various polymorphic regions are also available commercially as the PCR amplified product and are marketed together with the said primer synthesizing kit. Therefore, it is not necessary to subject the marker itself to the amplification formation treatment by the PCR technique. However, when the primer with added bases is to be used, it is necessary to use the allelic ladder size marker of the PCR amplified product formed from the base added primer as the standard. In contrast, when the original primer without the added base is to be used, it is necessary to use the allelic ladder size marker of the PCR amplified product formed from the original primer as the standard.

[0018] In gel electrophoresis, substances with about the same molecular weight will have about the same degree of migration. Therefore, the to-be-analyzed DNA fragment having about the same number of bp as that of each fraction of the marker will give the migration pattern (ladder pattern) about the same as that of each fraction of the marker. The number of base pairs (bp number) of each ladder image fraction of the allelic ladder size marker shown by M in Figure 2 is known and the number of repeats of the polymorphism (e.g., [AATG]) in that fraction is also known. Consequently, the ladder fraction of the to-be-analyzed DNA fragment located at the position identical to that of the ladder fraction part of the allelic ladder size marker standard having a specified number of repeats will have the same number of repeats as that of the marker. In this way, the polymorphism analysis of the to-be-analyzed DNA fragment can be carried out.

[0019] As for the fluorescence sequencer itself needed for implementation of the polymorphism analysis procedure of the present invention, any well-known sequencer may be used. Such sequencers include, e.g., the device described in Patent Disclosure No. Hei 7-[1995]-98,276. A specified amount of the fluorescence-labeled PCR amplified product of the allelic ladder size marker standard and a specified amount of the fluorescence-labeled PCR amplified product of the to-be-analyzed DNA specimen are injected into the concave part at the upper end of each electrophoresis lane of the gel electrolyte layer in the electrophoresis plate of the said device. A voltage is applied to the said electrolyte layer to allow each of the fluorescence-labeled PCR amplified products mentioned above to migrate. The migrated amplified products are irradiated with laser beams at the positions away from the said concave part by a certain distance. The fluorescence emitted from the product is received by a fluorescence detection mean and the input light signal is output as a ladder pattern. The ladder pattern of the fluorescence-labeled PCR amplified product of the allelic ladder size marker standard and the ladder pattern of the fluorescence-labeled PCR amplified product of the to-be-analyzed DNA specimen are compared and the number of repeats of the polymorphism is analyzed.

[0020]

[Actual Examples] The polymorphism analysis method of the present invention is explained specifically below with the use of actual examples.

#### Actual Example 1

##### Object of the Experiment

An experiment for the determination of parentage was carried out by examining the number of repeats of the TH01 polymorphic region made of the tandem base of [AATG].

##### [0021] Step 1: Extraction of DNA Specimen

Chromosomal DNA specimens extracted from human peripheral lymphocytes of three test subjects were purified and subject to the procedures described below.

##### [0022] Step 2: Amplification, Extraction and Purification of the Target DNA Region

For the amplification of the region containing TH01 polymorphism, the heat-resistant enzyme Taq polymerase was used and the PCR technique was used for the amplification. The primers used in the PCR amplification were prepared with the use of the Cyclon Plus DNA/RNA synthesizer.

Primer 1:

5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3'

Primer 2:

5'-\*ATTCAAAGGGTACTCGGGCTCTGG-3'

(\* in primer 2 denotes a fluorescence dye made of Texas Red)

The primers 1 and 2 at a concentration of 7 picomoles each, the chromosomal DNA in a quantity of 10-50 ng and Taq polymerase in a quantity of 2 units were mixed and a buffer with the optimum concentration was added to make the final volume of the mixture to be 50  $\mu$ L. This mixture was subject to the PCR amplification process. The PCR cycle described below was carried out. One cycle included the following reactions:

Dissociation reaction: temperature 94°C, reaction time 60 seconds

Annealing reaction: temperature 58°C, reaction time 45 seconds

Elongation reaction: temperature 72°C, reaction time 45 seconds

Thirty cycles were carried out. The PCR product obtained by this amplification reaction was a double stranded DNA with its entire length made of 179-203 bp. Primer 2 was labeled with a fluorescence dye and thus the amplified PCR product obtained should also be labeled with the fluorescence dye.

[0023] Step 3: Separation and Detection of DNA Fragments

A SQ-5500 (laser beam source: helium neon laser) available commercially from Hitachi Denshi Engineering Co. was used to subject the fluorescence-labeled PCR amplified product obtained in said step 2 as well as the fluorescence-labeled allelic ladder size marker standard of the TH01 polymorphic region to the gel electrophoresis analysis under the following conditions: separation path of fragment 200 mm, 5% Long Ranger Gel, applied voltage 1000 volts and TBE buffer (a solution mixture consisting of 0.09 mol of Tris, 0.09 mol of boric acid and 0.002 mol of EDTA, pH 8.0). The detected ladder patterns are shown in Figure 1.

[0024] Step 4: Addition of Bases to the Primer

The Beckman DNA synthesizer was used to add two bases of AT to the 5' terminal of primer 1 used in said step 2 to synthesize the primer with the following sequence: 5'-ATGTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3'.

[0025] Step 5: Preparation of the Standard Allelic Ladder Size Marker Using the Base-added Primer

The base-added primer 1 obtained from step 4 and the fluorescence-dye-added primer 2 obtained from step 2 were used to prepare the fluorescence-labeled PCR amplified product for use as the standard allelic ladder size marker, using the PCR method explained in step 2.

[0026] Step 6: Amplification, Extraction and Purification of the Target DNA Region Using the Base-added Primer

The base-added primer obtained from step 4 and the fluorescence-added primer 2 obtained from step 2 were used to prepare the fluorescence-labeled PCR amplified product of the target DNA region to be analyzed, using the PCR method described in step 2.

[0027] Step 7: Separation and Detection of DNA Fragments

Separation and detection of the DNA fragments were carried out according to the procedure described in step 4. The detected ladder patterns together with the ladder patterns obtained from step 4 are shown in Figure 1. In Figure 1, the allelic ladder marker in step 4 is indicated by "M" and "M<sub>A</sub>" indicates the allelic ladder marker in step 7. The results shown in Figure 1 indicate that adding two bases to the primer used in the PCR method could produce significant differences in the migration pattern compared with the migration of the ladder pattern of the amplified product using the original primer. In this way, two kinds of specimens could be analyzed simultaneously using only one single fluorescence dye.

[0028]

[Effect of the Invention] As explained above, in the present invention, the addition of bases to the primer can produce a molecular weight difference between the PCR amplified product of the original primer and the amplified

product of the base-added primer and hence the difference in the degree of their electrophoresis migrations. In this way, different ladder patterns of electrophoresis can be obtained and the simultaneous analysis of two-kinds of specimens can be achieved with high resolution even with the use of a single fluorescence dye.

[0029] Since only one kind of fluorescence dye is used, the structures of the excitation light source and the light receiving system can be simplified. Furthermore, there is only one kind of fluorescence to be detected and thus the process for the separation of fluorescence by physical filter or software becomes unnecessary. In addition, it becomes possible to determine the size of all gene loci with high accuracy using a commonly used monochromatic size marker.

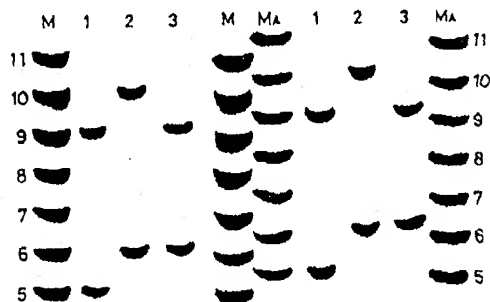
#### [Brief Description of the Figures]

[Figure 1] Ladder patterns showing the gel electrophoresis migration states of the PCR amplified product in Actual Example 1 and the standard allelic ladder size marker.

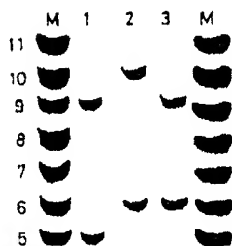
[Figure 2] Ladder patterns showing one example of polymorphism analyses that can be used in the determination of parentage.

[Figure 3] A schematic diagram used to explain the principle of the PCR technique.

[Figure 1]



[Figure 2]

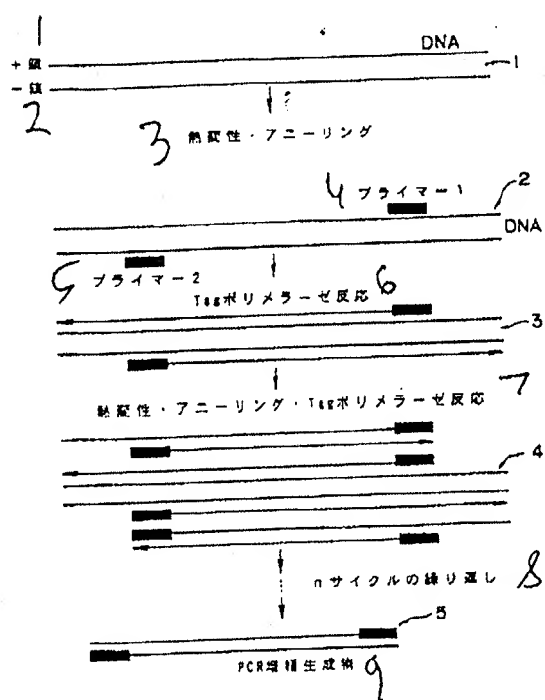




[Figure 3]

## KEY:

- (1) + chain
- (2) - chain
- (3) heat denaturation - annealing
- (4) primer 1
- (5) primer 2
- (6) Taq polymerase reaction
- (7) heat denaturation - annealing - Taq polymerase reaction
- (8) repeat of n cycles
- (9) PCR amplified product



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-84999

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 15/09

Z N A

G 0 1 N 21/64

Z

G 0 1 N 21/64

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平8-269370

(22) 出願日

平成8年(1996) 9月19日

(71) 出願人 000233480

日立電子エンジニアリング株式会社

東京都渋谷区東3丁目16番3号

(72) 発明者 萩原 久

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子  
エンジニアリング株式会社内

(72) 発明者 白井 三平

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子  
エンジニアリング株式会社内

(72) 発明者 桜井 利之

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子  
エンジニアリング株式会社内

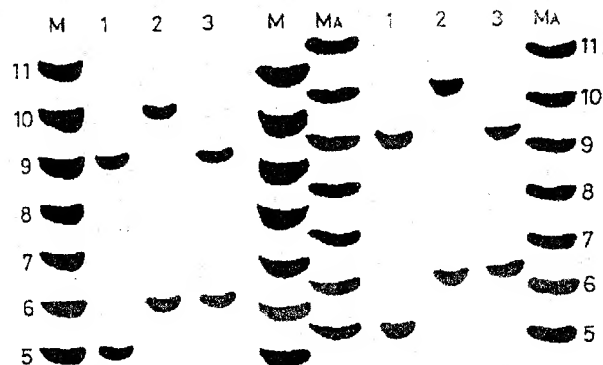
(74) 代理人 弁理士 梶山 佑是 (外1名)

(54) 【発明の名称】 多型解析方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 単一の蛍光色素でも、同時に複数種類の検体を分析できる新規な多型解析方法の提供。

【解決手段】 2種類のプライマーとDNA検体との混合物をPCR法で増幅し、蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の泳動レーンに注入して電気泳動することによりゲル電解質層内を移動させ、移動してきた蛍光標識増幅生成物に励起光を照射し、この生成物から発生される蛍光を測定することにより被分析核酸検体のラダーパターンを生成し、これを基準ラダーパターンと比較する多型解析方法において、前記非蛍光標識プライマーに、1個以上、前記多型領域を構成する塩基の数から1を減じた数以下の塩基を付加し、この塩基付加プライマーを用いてPCR増幅生成物を生成し、これと共に、塩基の付加されていない元のプライマーから得られたPCR増幅生成物を電気泳動することにより2種類以上の検体を同時に分析する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析すべきDNA検体に特定の多型領域を挟み込むように設計された2種類のプライマーのうちの一方を単一の蛍光色素で標識し、この蛍光標識プライマーと非蛍光標識プライマーとDNA検体との混合物をPCR法で増幅し、この蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の泳動レーンに注入して電気泳動することによりゲル電解質層内を移動させ、移動してきた蛍光標識増幅生成物に励起光を照射し、この生成物から発生される蛍光を測定することにより被分析核酸検体のラダーパターンを生成し、このラダーパターンを同一の多型領域を有する基準となるアレリックラダーサイズマーカーの基準ラダーパターンと比較することにより被分析DNA検体の多型繰り返し数を検出することからなる多型解析方法において、

前記非蛍光標識プライマーに、1個以上、前記多型領域を構成する塩基の数から1を減じた数以下の塩基を付加し、この塩基付加プライマーを用いてPCR増幅生成物を生成し、この塩基付加プライマーから得られたPCR増幅生成物と共に、塩基の付加されていない元のプライマーから得られたPCR増幅生成物を電気泳動することにより2種類以上の検体を同時に分析することを特徴とする多型解析方法。

【請求項2】 アレリックラダーサイズマーカーとして、[AATG]の4塩基の連なりからなるTHO1の多型領域のものを使用し、プライマーに1〜3個の塩基を付加することにより、同時に4種類の検体を分析する請求項1の多型解析方法

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNAなどの核酸の断片長分析における多サンプル処理を可能とするフラグメント解析方法に関する。更に詳細には、本発明は蛍光式フラグメント分析装置において、DNAの断片長分析における同塩基対 (bp) サイズ領域の複数分析を可能とする多型解析方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】DNAの機能解析から得られる情報は数知れない。例えば、特徴的な遺伝子の、アデニン

(A)、グアニン(G)、チミン(T)及びシトシン

(C)からなる塩基配列を知ることによって、種の同定や、鑑定を行うことが可能となる。これらの機能解析は例えば、蛍光式シーケンサを使用して処理することができる。

【0003】動物でも植物でも、塩基配列中に特異的な塩基の連なりからなる繰り返しがあることが知られている。また、この繰り返しの数が個々の個体により異なっているものを“多型”と呼んでいる。この塩基の連なり

Repeat)といい、この2〜5bpの配列による種の同定や固体の識別を行う方法はSTR法と呼ばれる。

【0004】例えば、ヒトの個人識別にはTHO1と呼ばれている[AATG]の4個の塩基の連なりからなる多型領域が用いられている。この場合、多型部分を含む領域を蛍光標識してPCR法で増幅し、電気泳動手段を備えた蛍光シーケンサで検出すると、多型領域の繰り返しの数によりDNA断片の泳動速度(移動度)が異なり、幾つかのパターン分けを行うことができる。

【0005】ヒトの遺伝子は父親から1セット(22本の常染色体と性染色体1本)、母親から1セットを受けた2セット(44本の常染色体と性染色体2本)からなっている。例えば、[AATG]という塩基の繰り返し領域を、父が5回(すなわち、-AATGAATGAATGAATGAATG-)と9回(すなわち、-AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG-)、母が6回と10回の場合、その子供は5-6、5-10、9-6、9-10の4つのタイプの何れかの繰り返し領域を有することとなる。親子鑑定等にはこのような型の状態を確認すればよいこととなる。また、個体を識別する場合もこのような領域を複数箇所調べることで、その人であることの確からしさが増していく。

【0006】図2はTHO1のアレリックラダーマーカーを用いて親子鑑別を行ったラダーパターンの一例である。THO1のアレリックラダーマーカー自体は公知であり、米国のアプロメガ(Promega)社からジーンプリント(GenePrint)STRシステムズとして一般に市販されている。両親及び子供から採取した、基となるDNAにTHO1の多型領域を挟み込むように設計された、蛍光色素で標識されたプライマーをPCR法により増幅し、蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の各泳動レーンに注入して電気泳動すると図2に示されるようなラダーパターンが得られる。Mは基準となるアレリックラダーマーカーであり、その左側の数字は多型の繰り返し数である。このラダーパターンから明らかなように、レーン1に注入された父親は5回と9回の繰り返し数を有し、レーン2に注入された母親は6回と10回の繰り返し数を有し、レーン3に注入された子供は9回と6回の繰り返し数を有する。従って、この結果から、この子供は両親と遺伝学的な親子関係を有することが確認される。

【0007】個体識別などの場合、識別の信頼性を確保するために、単一の多型領域だけでなく、他の多型領域についても同様な分析を行うことが必要である。例えば、THO1の多型領域と共にF13Bの多型領域を用いて個体識別を行うことがある。F13Bの多型領域は[AAAT]からなる塩基の連なりを有する。しかし、THO1の多型領域を有するアレリックラダーのサイズ

するアレリックラダーのサイズは169~189bpであり、TH01の多型領域の既知繰り返し数は5, 6, 7, 8, 9, 9, 3, 10, 11であり、F13Bの多型領域の既知繰り返し数は6, 7, 8, 9, 10, 11である。従って、この2つの多型領域を使用して個体識別を行うと、得られたラダーパターンに重複部が生じてしまうことがある。

【0008】このため、従来の蛍光シーケンサによる多型分析では、各多型領域を有するプライマーを、異なる励起波長を有する別々の蛍光色素で標識していた。プライマーを標識する蛍光色素が異なるため、各プライマーから生じる蛍光の波長も異なる。従って、各蛍光波長に対応するデータに対し、例えば、緑色と赤色を指定しておき、得られたデータを緑色と赤色でCRTスクリーンに表示したり、カラープリンターで出力すれば、たとえDNA断片のbpサイズが同一のために、ラダーパターンが重複しても、各ラダーパターンがどの多型領域に帰属するか明確に区別することができる。

【0009】しかし、このような複数の蛍光色素を使用する場合、分析に使用される蛍光シーケンサ自体が、使用される蛍光色素の数に対応する個数の励起光源又は複数の蛍光波長を分別するための複数のバンドパスフィルタを備えていなければならない。励起光源やバンドパスフィルタを複数個配設すると、蛍光シーケンサの光源系及び受光系の構造が複雑化し、装置全体が大型化するばかりか、シーケンサのコストが大幅に上昇し好ましくない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、単一の蛍光色素でも、同時に複数種類の検体を分析することができる新規な多型解析方法を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】前記課題は、分析すべきDNA検体に特定の多型領域を挟み込むように設計された2種類のプライマーのうち的一方を単一の蛍光色素で標識し、この蛍光標識プライマーと非蛍光標識プライマーとDNA検体との混合物をPCR法で増幅し、この蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の泳動レーンに注入して電気泳動することによりゲル電解質層内を移動させ、移動してきた蛍光標識増幅生成物に励起光を照射し、この生成物から発生される蛍光を測定することにより被分析核酸検体のラダーパターンを生成し、このラダーパターンを同一の多型領域を有する基準となるアレリックラダーサイズマーカーの基準ラダーパターンと比較することにより被分析DNA検体の多型繰り返し数を検出することからなる多型解析方法において、前記非蛍光標識プライマーに、1個以上、前記多型領域を構成する塩基の数から1を減じた数以下の塩基を

成物を生成し、この塩基付加プライマーから得られたPCR増幅生成物と共に、塩基の付加されていない元のプライマーから得られたPCR増幅生成物を電気泳動することにより2種類以上の検体を同時に分析することの特徴とする多型解析方法により解決される。

【0012】

【発明の実施の形態】基準となるアレリックラダーサイズマーカーとして、例えば、TH01の多型領域のものをを使用する場合、この多型領域は「AATG」の4塩基からなるので、本発明によれば、PCR法で使用するプライマーに塩基を1個、2個又は3個付加することができる。これにより、塩基が付加されていない元のプライマーを含めて4種類のプライマーが使用できるので、同時に4検体の分析が可能となる。

【0013】本発明の多型解析方法で使用するのに必要なPCR増幅生成物を生成するためのPCR法自体は当業者に公知である。図3はこのPCR法の原理を説明する模式的工程図である。まず、ステップ1で、分析すべき目的のDNA検体を準備する。DNA検体はヒトの髪の毛、ツメ、皮膚、血液、リンパ球など任意のものを使用できる。次いで、ステップ2で、この目的のDNA検体の2本鎖にそれぞれ適当な2種類のプライマー（例えば、20mer程度のオリゴヌクレオチド）を選び、これらを混合し、熱変性及びアニーリング処理してDNA合成を行わせる。熱変性・アニーリング処理により合成されたDNAをTaqポリメラーゼ反応により一本鎖にする（ステップ3）。その後、温度を変化させるだけで、熱変性・アニーリング・Taqポリメラーゼ反応が進行する（ステップ4）。このステップをn回繰り返す。理論的に、1ステップ毎にDNAは2倍に合成される。従って、n回のステップ終了後には、分析すべきDNAは $2^n$ 倍に増幅され、増幅生成物が得られる（ステップ5）。

【0014】本発明の多型解析方法で使用するのに必要なPCR増幅生成物を生成するためのプライマーは各多型領域に適したものが、米国のプロメガ(Prømega)社からジーンプリント(GenePrint)STRシステムズとして一般に市販されている。従って、実際の分析では、プロメガ社から各多型領域に適したプライマー合成キットを購入し、この合成キットに分析すべきDNA検体を混合してPCR法を実行すれば、目的とするDNA増幅生成物を容易に得ることができる。

【0015】プライマーのサイズを変更するために、プライマーに1~3個の塩基を付加することは、市販のDNA合成器を使用することにより容易に実施できる。このようなDNA合成器としては、例えば、米国のミリポア(Millipore)社のサイクロン(CYCLON)（登録商標）プラスDNA/RNAシンセサイザーなどを使用できる。塩基の付加はプライマー1又は2のうちの何れか一方

プライマー1だけに塩基を付加することが好ましい。プライマー2は蛍光標識の付加に使用されるからである。プライマー2へ塩基を付加し、プライマー1へ蛍光色素を付加することも当然できる。付加される塩基は特に限定されないが、DNA構成塩基と同じA、T、C、Gのうちから選択することが好ましい。また、この塩基の付加により既知の多型と同じ塩基配列が構成されないようにすることが好ましい。

【0016】プライマー2への蛍光色素の付加は市販のDNA合成器を使用することにより容易に実施できる。このようなDNA合成器としては、前記のサイクロン(CYCLON)プラスDNA/RNAシンセサイザーなどを使用できる。例えば、DNA合成器でプライマー2を合成する際、まず、プライマー2の末端部(すなわち、5'側又は5'末端)にアミノ基を付加し、その部位に蛍光色素を化学結合させる。プライマー2の5'末端へのアミノ基の付加もDNA合成器で行うことができる。本発明の方法で使用できる蛍光色素は特に限定されない。蛍光色素を励起するのにレーザ光を使用する場合、そのレーザ光の励起波長と、蛍光色素の発光波長との組み合わせを考慮して決定することができる。本発明で使用できる蛍光色素は例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)、イソチオシアン酸エオシン(EITC)、イソチオシアン酸テトラメチルローダミン(TMRICT)、置換イソチオシアン酸ローダミン(XRICT)、スルホローダミン101酸クロリド("テキサスレッド"の商標名で市販されている)などである。励起光源として波長が594nmのHe-Neレーザを使用する場合、蛍光色素は励起極大波長が596nm、発光極大波長が615nmのテキサスレッドを使用することが好ましい。また、波長が488nmのアルゴンイオンレーザを使用する場合、蛍光色素はFITCを使用することが好ましい。プライマーとDNA鎖(PCR産物)のハイブリッド化を妨げたり、ポリメラーゼによる3'末端方向への伸長反応を妨げなければ、化学発光試薬などを使用することも可能である。

【0017】また、各多型領域を有する基準となるアレリックラダーサイズマーカーはPCR増幅生成物として、前記プライマー合成キットと共に販売される。従って、マーカー自体はPCR法により増幅生成処理する必要はない。しかし、塩基を付加したプライマーを使用する場合、この塩基付加プライマーから生成されたPCR増幅生成物のアレリックラダーサイズマーカーを基準として使用しなければならない。一方、塩基を付加されていない元のプライマーを使用する場合は、この元のプライマーから生成されたPCR増幅生成物のアレリックラダーサイズマーカーを基準として使用しなければならない。

【0018】ゲル電気泳動の場合、分子量の大体同じ物

ラクシオンと大体同じbp数を有する被分析DNA断片はマーカーの各フラクシオンと大体同じ様な移動パターン(ラダーパターン)を示す。図2においてMで示されるアレリックラダーサイズマーカーの各ラダーイメージフラクシオンの塩基対長(bp数)は既知であり、そのフラクシオン内の多型(例えば、[AATG])の繰返し数も既知である。従って、基準となるアレリックラダーサイズマーカーの所定の繰返し数のラダーフラクシオン部分と同じ位置に存在する被分析DNA断片のラダーフラクシオンはマーカーと同じ繰返し数を有することとなる。このようにして被分析DNA断片の多型解析が行われる。

【0019】本発明の多型解析方法を実施するのに使用される蛍光シーケンサ自体は公知のシーケンサを使用することができる。このようなシーケンサとしては例えば、特開平7-98276号公報に記載されるような装置を好適に使用することができる。この装置の泳動板中のゲル電解質層の各泳動レーン上端の凹部に、基準となるアレリックラダーサイズマーカーの蛍光標識PCR増幅生成物と、分析すべきDNA検体の蛍光標識PCR増幅生成物を所定量注入し、前記電解質層に電圧を印加し前記各蛍光標識PCR増幅生成物を泳動させ、前記凹部より所定の距離を隔てた位置で、レーザ光を、泳動してきた増幅生成物に照射し、該生成物から放出された蛍光を蛍光検出手段で受光し、この受光信号をラダーパターンとして出力する。そして、基準となるアレリックラダーサイズマーカーの蛍光標識PCR増幅生成物のラダーパターンと分析すべきDNA検体の蛍光標識PCR増幅生成物のラダーパターンとを比較し、多型の繰返し数の解析を行う。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明の多型解析方法を具体的に例証する。

#### 実施例1

##### 実験の目的

[AATG]の塩基の連なりからなるTH01多型領域の繰返し数を検査することにより親子鑑定実験を行った。

##### 【0021】ステップ1: DNA検体の抽出

3人の被験者のヒト末梢血リンパ球より、抽出・精製した染色体DNAを用いて以下の操作を行った。

##### 【0022】ステップ2: 標的DNA領域の増幅・抽出・精製

TH01多型を含む領域の増幅には、耐熱性酵素Taqポリメラーゼを使用し、PCR法により増幅を行った。PCR増幅を行う際のプライマーは、次のものをサイクロンプラスDNA/RNA合成器で作製して用いた。

プライマー1:

5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATT

プライマー2:

5'-\*ATTCAAAGGGTACTCGGGCTCTGG-3'

(プライマー2における\*はテキサスレッドからなる蛍光色素を示す。)

このプライマー1と2の濃度が各7ピコモル、染色体DNA量が10~50ng、Taqポリメラーゼが2単位となるようにそれぞれを加え、更に最適濃度のバッファー(緩衝液)を加え、最終容量を50μlとし、PCR増幅を行った。PCRのサイクルは、

解離反応: 温度 94℃、反応時間 60秒間

対合反応: 温度 58℃、反応時間 45秒間

伸長反応: 温度 72℃、反応時間 45秒間

を1サイクル反応として、30サイクル行った。この増幅反応により得られるPCR産物は全長が179~203bpからなる2本鎖DNAであった。プライマー2には蛍光色素が付加されているので、増幅されたPCR生成物は蛍光色素で標識されていることとなる。

【0023】ステップ3: DNA断片の分離及び検出

日立電子エンジニアリング社から市販されているSQ-5500(レーザー光源:ヘリウムネオンレーザー)を使用し、断片の分離路長200mm、5%ロングレンジャーゲル、印加電圧1000ボルト、緩衝液TBEバッファー(0.09モルのトリス、0.09モルのホウ酸および0.002モルのEDTAからなるpH8.0の混合液)の条件により、前記ステップ2で得られた蛍光標識PCR増幅生成物を、基準となるTHO1多型領域の蛍光標識アレリックラダーサイズマーカーと共にゲル電気泳動分析した。この検出ラダーパターンを図1に示す。

【0024】ステップ4: プライマーへの塩基付加

前記ステップ2で使用されたプライマー1の5'末端にATの2塩基をベックマンDNAシンセサイザーを用いて付加し、下記の配列を有するプライマーを合成した。  
5'-ATGTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3'

【0025】ステップ5: 塩基付加プライマーを用いた基準アレリックラダーサイズマーカーの作製

ステップ4で得られた塩基付加プライマーと、ステップ2における蛍光色素が付加されたプライマー2を使用し、基準アレリックラダーサイズマーカーとして使用すべき蛍光標識PCR増幅生成物を、ステップ2で説明したPCR法により作製した。

【0026】ステップ6: 塩基付加プライマーを用いた標的DNA領域の増幅・抽出・精製

ステップ4で得られた塩基付加プライマーと、ステップ2における蛍光色素が付加されたプライマー2を使用し、分析すべき標的DNA領域の蛍光標識PCR増幅生成物を、ステップ2で説明したPCR法により作製した。

【0027】ステップ7: DNA断片の分離及び検出

前記ステップ4と同様にしてDNA断片の分離及び検出を行った。この検出ラダーパターンをステップ4のラダーパターンと共に図1に示す。図1において、ステップ4におけるアレリックラダーマーカーは“M”で示され、ステップ7におけるアレリックラダーマーカーは“M<sub>0</sub>”で示されている。図1に示された結果から明らかのように、PCR法で使用されるプライマーに塩基を2個付加することにより、元のプライマーを用いた増幅生成物のラダーパターンとの間に明確な移動差を生じさせることができた。斯くして、単一の蛍光色素でも、同時に2種類の検体を分析することができた。

【0028】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、プライマーに塩基を付加することにより、元のプライマーからPCR法により増幅された生成物と塩基付加プライマーからの増幅生成物とに分子量差を付け、電気泳動における移動度に差を生じさせる。これにより、電気泳動のラダーパターンに差が生じ、単一の蛍光色素でも2種類の検体を高い分解能で同時に分析することができ

る。  
【0029】また、使用する蛍光色素が1種類のため、励起光源、受光系の構造を簡単にできる。更に、検出する蛍光が1種類のため、物理的なフィルタ又はソフトウェアなどによる蛍光の分離処理が必要ない。また、汎用的な単色のサイズマーカーを使用して、全ての遺伝子座に対して高精度なサイズ決定が可能となる。

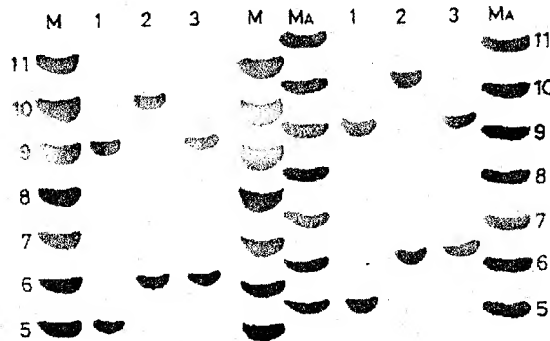
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1におけるPCR増幅生成物と基準となるアレリックラダーサイズマーカーのゲル電気泳動による移動状態を示すラダーパターン図である。

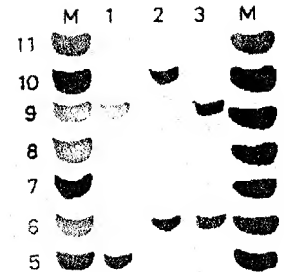
【図2】親子鑑定などに使用される多型解析の一例を示すラダーパターン図である。

【図3】PCR法の原理を説明する模式的工程図である。

【図1】



【図2】



【図3】

